

RO/KR 02.04.2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0021065

Application Number

출원년월일 : 2003년 04월 03일

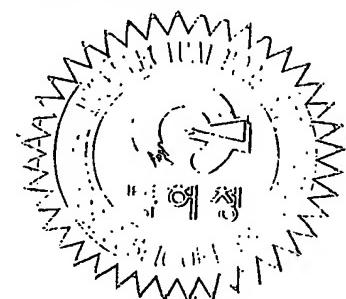
Date of Application APR 03, 2003

PRIORITY DOCUMENT

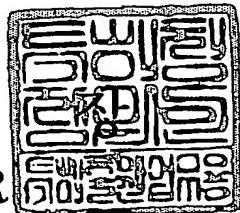
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

출원인 : 주식회사 리젠 바이오텍
Applicant(s) REGEN BIOTECH, INC.

2004 년 04 월 02 일



특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.03
【발명의 명칭】	YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제
【발명의 영문명칭】	Agent for inhibiting angiogenesis, containing peptides which comprise YH motif as effective component
【출원인】	
【명칭】	주식회사 리젠 바이오텍
【출원인코드】	1-2000-037614-6
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2000-066599-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김인산
【성명의 영문표기】	KIM, In-San
【주민등록번호】	590831-1790012
【우편번호】	706-140
【주소】	대구광역시 수성구 매호동 1040번지 동서타운 106동 908호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	남주옥
【성명의 영문표기】	NAM, Ju-Ock
【주민등록번호】	731120-2233812
【우편번호】	706-813
【주소】	대구광역시 수성구 범물동 1292-11
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	8
【서열목록의 전자파일】	첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	40 면	40,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	11 항	461,000 원
【합계】		530,000 원
【감면사유】		소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】		159,000 원
【첨부서류】		1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(angiogenesis) 억제제에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 β ig-h3 단백질의 fas-1 도메인에 존재하는 YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제에 관한 것이다. 본 발명의 YH 모티프는 $\alpha v \beta 3$ 인테그린과 작용하여 β ig-h3 단백질에 의해 매개되는 내피세포 부착 및 세포 이동을 억제함으로써 혈관신생을 억제할 수 있으므로, 상기 모티프를 포함하는 억제제는 혈관신생과 관련된 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 7

【명세서】**【발명의 명칭】**

YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제{Agent for inhibiting angiogenesis, containing peptides which comprise YH motif as effective component}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 β ig-h3 의 fas-1 도메인 각각을 포함하는 재조합 단백질의 모식도를 나타낸 것이고,

도 2a는 β ig-h3 또는 각각의 fas-1 도메인으로 코팅한 플레이트에 HUVEC 세포의 부착 정도를 흡광도로 나타낸 그래프이고,

야생형 : 정상 β ig-h3,

D-I : 1번째 fas-1 도메인,

D-II : 2번째 fas-1 도메인,

D-III : 3번째 fas-1 도메인,

D-IV : 4번째 fas-1 도메인,

BSA : 대조군인 우월청 알부민(bovine serum albumin),

도 2b는 여러 가지 인테그린에 대한 기능블록 항체를 이용하여 β ig-h3에 HUVEC 세포가 부착하는 것을 저해하는 정도를 나타낸 그래프이고,

α 3 : P1B5(α 3에 대한 항체),

α 5 : P1D6(α 5에 대한 항체),

α v : P3G8(α v에 대한 항체),

β 1 : 6S6(β 1에 대한 항체),

β 3 : B3A(β 3에 대한 항체),

α v β 3 : LM609(α v β 3에 대한 항체),

$\alpha\text{v}\beta 5$: P1F6($\alpha\text{v}\beta 5$ 에 대한 항체),

도 2c는 $\alpha\text{v}\beta 3$ 및 $\alpha\text{v}\beta 5$ 인테그린에 대한 기능블록 항체를 이용하여 각각의 fas-1 도메인에 HUVEC 세포가 부착하는 것을 저해하는 정도를 나타낸 그래프이고,

도 2d는 $\beta\text{ig-h3}$ 의 내피세포 부착에 관여하는 수용체를 동정하기 위하여, $\beta\text{ig-h3}$ 에 바이오틴(biotin)을 붙인(labelling) 바이오틴- $\beta\text{ig-h3}$ 및 β -튜블린 단백질 농도에 따른 HUVEC 세포의 부착능의 변화(A) 및 $\alpha\text{v}\beta 3$ 및 $\alpha\text{v}\beta 5$ 인테그린에 대한 기능블록 항체의 농도에 따른 바이오틴- $\beta\text{ig-h3}$ 및 β -튜블린 단백질에 의한 내피세포의 부착능의 저해(B)를 웨스턴-면역블로팅으로 나타낸 전기영동사진이고,

도 3a는 $\beta\text{ig-h3}$ 의 다섯 가지의 H1 및/또는 H2 결실 재조합 단백질에 대한 개략도이고,

도 3b는 4번째 fas-1 도메인 변이체(D-IV-LAAR)의 개략도 및 HUVEC 세포부착에 상기의 변이체가 미치는 영향을 나타낸 그래프이고,

D-IV : 서열번호 6으로 기재되는 4번째 fas-1 도메인,

$\Delta\text{H1H2}(6)$: 4번째 fas-1 도메인의 H1 및 H2가 결실된 서열번호 5로 기재되는 548 내지 614번 아미노산 절편으로 이루어진 변이체,

D-IV-LAAR : 4번째 fas-1 도메인의 티로신 및 히스티딘을 알라닌으로, 루신 및 이소루신을 세린으로 치환한 서열번호 7로 기재되는 변이체,

도 3c는 $\beta\text{ig-h3}$ 에 HUVEC 세포가 부착하는 것을 YH18 패타이드가 농도-의존적으로 저해하는 정도를 나타낸 그래프이고,

D-I YH18 : 서열번호 1의 패타이드, D-II YH18 : 서열번호 2의 패타이드,

D-III YH18 : 서열번호 3의 패타이드, D-IV YH18 : 서열번호 4의 패타이드,

YH18-con. : 서열번호 8의 펩타이드,

도 4a는 $\beta 3$ 인테그린 발현벡터로 안정하게 형질전환된 HEK 293 세포가 $\beta ig-h3$ 에 부착하는 정도를 나타낸 그래프이고,

pc/293 : pcDNA3 벡터로 형질전환된 HEK 293 세포,

$\beta 3/293$: $\beta 3$ 인테그린 발현벡터로 형질전환된 HEK 293 세포,

도 4b는 여러 가지 인테그린에 대한 기능블록 항체를 이용하여 $\beta ig-h3$ 에 $\beta 3/293$ 세포가 부착하는 것을 저해하는 정도를 나타낸 그래프이고,

도 4c는 $\beta ig-h3$ 에 $\beta 3/293$ 세포가 부착하는 것을 YH18 펩타이드가 농도-의존적으로 저해하는 정도를 나타낸 그래프이고,

도 5a는 $\alpha v\beta 3$ 및 $\alpha v\beta 5$ 인테그린에 대한 기능블록 항체를 이용하여 $\beta ig-h3$ 에 의한 HUVEC 세포의 이동이 저해되는 것을 나타낸 사진(A) 및 그래프(B)이고,

$\alpha v\beta 3$; LM609, $\alpha v\beta 5$; P1F6

도 5b는 YH18 펩타이드에 의하여 $\beta ig-h3$ 에 의한 HUVEC 세포의 이동이 저해되는 것을 나타낸 사진(A) 및 그래프(B)이고,

도 6은 YH18 펩타이드에 의하여 HUVEC 세포의 튜브 형성이 저해되는 것을 나타낸 사진(A) 및 그래프(B)이고,

도 7은 YH18 펩타이드에 의하여 혈관신생이 저해되는 것을 나타낸 사진(상단) 및 절단면 사진(중단)과 이에 대한 그래프(하단)이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <33> 본 발명은 YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기능적 세포 수용체로서 $\alpha v \beta 3$ 인테그린과 결합하여 세포 부착 및 세포 이동을 억제함으로써 혈관신생을 억제하는 활성을 갖는 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제에 관한 것이다.
- <34> 인체 조직을 구성하고 있는 모든 세포들의 생존에는 혈관에 의한 산소와 영양분 공급이 필수적이며, 인체 조직의 모든 부분에는 혈관의 그물망이 존재하고 그 총 길이는 약 10만 km에 달하여 인체의 각 기관과 조직의 정상적인 기능과 대사활동에 절대적으로 필요하다. 혈관의 생성기전은 높은 관심사에도 불구하고 거의 연구가 이루어지지 않은 분야로서 1991년에 비로소 혈관 형성(vasculogenesis)과 신생으로 정의할 수 있는 혈관신생(angiogenesis)의 두 가지 다른 경로로 구분이 되어 혈관생성 개념이 정립되기 시작한 이후 그 연구에 관심이 높아지고 있다.
- <35> 혈관신생은 발생과정이나 생식, 그리고 조직과 기관의 성장 및 상처의 치료시에 필수적으로 수반되는 과정으로 적절하게 조절되지 못하면 암을 포함한 관절염(arthritis)이나 건선(psoriasis), 당뇨성 퇴행성안질환(diabetic retinopathy), 동맥경화(atherosclerosis) 및 염증반응(inflammation) 등 생체 내에서의 여러 가지 질병을 유발한다. 혈관신생은 암의 성장과

전이에도 필수적인 단계로 알려져 있으며 암 조직에서의 혈관신생이 발달하면 할수록 다른 조직으로의 전이가 일어날 수 있는 확률이 높다고 보고되고 있다(Weidner, N. et al., ., 324, 1-8, 1991).

<36> 혈관신생의 기전에 대한 연구 및 이를 억제할 수 있는 물질의 발견은 암을 포함한 여러 질병의 예방 및 치료에 있어서 중요한 관심의 초점이 되고 있다. 혈관신생의 대표적인 조절기전은 VEGF(vascular endothelium-specific growth factor) 패밀리, 앤지오포이에틴 패밀리(angiopoietin family), 에프린 패밀리(ephrin family)와 그 수용체들과의 상호작용에 의해 조절됨이 밝혀지고 있으나 정확한 기전에 대한 보고는 아직 이루어지지 않고 있다(Soker, S. et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 31582-31588, 1977; Carlson, TR. et al., *J. Biol. Chem.*, 276, 26516-26525, 2001; Adams, RH. et al., *Genes Dev.*, 13, 295-306, 1999).

<37> 혈관신생 억제에 관한 연구는, 혈관신생의 과정에 있어서 강력한 유도인자로 알려져 있는 VEGF와 bFGF(basic fibroblast growth factor) 등의 작용을 억제하기 위하여 경쟁물질을 투여하는 방법과 암세포의 전이를 억제하기 위하여 혈관내피세포에서의 인테그린(integrin)의 발현을 조절하는 방법 등 다양한 방법으로 여러 가지 타켓 유전자를 대상으로 하여 진행되고 있다. 암과의 관련성에 대해서는 혈관의 흡수와 암세포에 의해 유도되는 혈관신생과의 상관관계 및 이때 작용하는 혈관신생 유도 단백질 등에 대해서 연구가 이루어지고 있으나 아직까지는 매우 미비한 상태이다.

<38> 혈관신생 유도억제 연구는 각종 질병의 진단 및 치료에 응용될 수 있으므로, 그동안 미국을 비롯한 각국의 여러 제약회사들이 혈관신생 억제제의 개발에 최선을 다하고 있다.

<39> β ig-h3는 인간의 흑색소 세포종 세포(human melanoma cells), 포유동물의 상피세포(mammary epithelial cells), 각질형성세포(keratinocytes) 및 폐섬유아세포(lung fibroblasts) 등을 포함하는 여러 종류의 세포에서 TGF- β 에 의해 유도되는 세포외 기질단백질(extracellular matrix protein)이다(Skonier, J. et al., *DNA Cell Biol.*, 13, 571, 1994). β ig-h3는 Skonier 등에 의해 TGF- β 1을 처리한 인간 혀파선암 세포(lung adenocarcinoma cells) A549로부터 제조된 cDNA 라이브러리의 스크리닝(differential screening)에 의하여 최초로 분리되었다. β ig-h3는 카르복실 말단에는 여러 가지 인테그린(integrin)에 대한 리간드 인식부위(ligand recognition)로 작용하는 Arg-Gly-Asp(RGD) 서열이 존재하고, 아미노 말단에는 분비서열(secretory sequence)이 존재하는 683개의 아미노산으로 구성되어 있음이 밝혀졌다(Skonier, J. et al., *DNA Cell Biol.*, 11, 511, 1992).

<40> 세포증식이 조절되는 여러 세포계에서 TGF- β 에 의하여 β ig-h3 유전자가 발현 유도되어 β ig-h3 mRNA와 단백질이 증가되기 때문에, β ig-h3이 TGF- β 의 신호 중 일부를 매개하는데 관여할 것으로 생각된다. 이와는 반대로, 희귀한 골질환인 국한성 유선상과골증(melorheostosis)에 걸린 피부손상 부위로부터 배양된 섬유아세포, 일부 종양세포계 및 덱싸메타손(dexamethasone)으로 처리된 골수간세포(stem cells)에서는 β ig-h3 발현이 감소되는 것이 보고되었다(Kim, J.E., et al., *J. Cell. Biochem.*, 77, 169-178, 2000). 이처럼 β ig-h3은 다양한 조직에서 세포외 기질 단백질 및 세포들 사이의 상호작용과 형태 형성에서 중요한 인자로 작용하는 것으로 보인다.

<41> 또한, β ig-h3는 세포 부착 분자(cell adhesion molecule)로서 세포 부착(attachment)과 탈착(detachment)을 매개하는 것으로 알려져 있다. 먼저, 정제된 β ig-h3는 피부 섬유아세포

의 부착과 확산을 촉진시키는 한편, 무혈청배지에서 A549, HeLa 및 WI-38 세포의 부착을 저해하였다. 특히, β Ig-h3는 종양세포의 성장, 콜로니 형성 및 출현을 저해하는 것으로 알려졌는데, 이는 차이니즈 햄스터의 난소 세포(Chinese hamster ovary cells)에 β Ig-h3 발현벡터를 전이(transfection)시킨 누드 마우스에서 상기 세포들의 종양 형성능이 현저하게 감소함이 보고됨으로써 확인되었다. 또한, 빠르고 효과적인 상처 치유를 위하여 유효한 양의 β Ig-h3을 상처에 적용함으로써 세포, 특히 섬유아세포가 상처부위에 퍼지고 점착하는 것을 촉진시킬 수 있는 방법이 개발되었다. 따라서, β Ig-h3은 여러 세포에서 TGF- β 에 의해 고도로 유도되는 세포 부착 분자로서 세포 성장(cell growth), 세포 분화(cell differentiation), 창상 치유(wound healing), 형태 형성(morphogenesis) 및 세포 부착(cell adhesion)에 있어 매우 중요한 역할을 담당한다고 할 수 있다(Rawe, I.M. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38, 893, 1997; Lebaron, R.G. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 104, 844, 1995)

<42> β Ig-h3는 RGD 모티프와 함께 상동성을 지닌 4개의 반복된 내부 도메인(internal domain)을 포함하고 있는데, 이 도메인은 포유류, 곤충, 성게, 식물, 효모 및 세균을 포함하는 여러 종의 분비 단백질 또는 막(membrane) 단백질에서 매우 보존적인 서열로서 발견된다. 상기 보존적 서열을 포함하는 단백질들에는 페리오스틴(periostin), 파스시클린 I(fasciclin I), 성게 HLC-2(sea urchin HLC-2), 조류의 알갈-CAM(Algal-CAM) 및 마이코박테리움 MPB70(*mycobacterium* MPB70) 등이 포함되는 것으로 밝혀졌다(Kawamoto, T. et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1395, 288, 1998). 이러한 단백질들에서 보존적으로 발견되는 상동성 도메인(이하 "fas-1 도메인"이라 약칭함)은 110 내지 140개의 아미노산으로 구성되며, 특히 상동성이 높은 약 10개의 아미노산으로 구성된 두 개의 가지(H1 및 H2)를 포함하고 있다. 상기

단백질들 중 β ig-h3을 포함하여 페리오스틴 및 파스시클린 I은 4개의 fas-1 도메인을 가지며, HLC-2는 2개, MPB70은 오직 한 개의 fas-1 도메인을 가지고 있다. 상기 단백질들의 생물학적 기능이 정확하게 밝혀진 것은 아니지만, 이들 중 몇몇이 세포 부착 분자(cell adhesion molecule)로서 작용함이 보고되었다. 예를 들면, β ig-h3, 페리오스틴 및 파스시클린 I은 각각 섬유아세포, 골아세포(osteoblast) 및 신경세포에서 세포 부착을 매개하는 것으로 보고되었으며, 알갈-CAM은 조류인 블록스(Vovolix)의 배(embryos)에 존재하는 세포 부착 분자임이 밝혀졌다(LeBaron, R.G., et al., *J. Invest. Dermatol.*, 104, 844, 1995; Horiuchi, K. et al., *J. Bone Miner. Res.*, 14, 1239, 1999; Huber, O. et al., *EMBO J.*, 13, 4212, 1994).

<43> 이와 같이 세포 부착 분자로서 β ig-h3의 세포 부착 활성은 인간의 피부 섬유아세포 (dermal fibroblasts)에서 최초로 보고된 후 연골아세포(chondrocytes), 복막 섬유아세포 (peritoneal fibroblasts) 및 인간의 MRC5 섬유아세포 등에서도 보고되었다. 초기에 β ig-h3의 세포 부착 활성은 C-말단에 존재하는 RGD 모티프에 의해 매개되는 것으로 생각되었으나, RGD 모티프가 연골아세포의 확산을 촉진하는데 필수적이지는 않으며, RGD 모티프가 결실된 성숙한 형태의 β ig-h3가 세포 부착을 억제할 수 있음이 보고되면서, RGD 모티프가 β ig-h3의 세포 부착 활성을 매개하는데 필수불가결한 요소가 아님이 확인되었다. 최근 연구에 의하면, β ig-h3은 인테그린 $\alpha 1\beta 1$ 에 특이적으로 인식되며, RGD 모티프와 관계없이 독자적으로 인테그린 $\alpha 1\beta 1$ 과 작용하여 세포의 부착과 확산을 촉진시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다(Ohno, S.

et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1451, 196, 1999). 또한, 본 발명자들은 β ig-h3가 α 3 β 1 인테그린(integrin)을 통하여 각막 상피 세포의 부착을 매개한다는 것을 확인하였으며, β ig-h3의 두 번째 및 네 번째 fas-1 도메인에 존재하는 α 3 β 1 인테그린과 상호작용하는 두 개 모티프의 동정을 보고한 바 있다(Kim, J-E. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275, 30907-30915, 2000). 그러나, 현재까지 이러한 β ig-h3가 혈관신생과 관련되어 있다는 보고는 없다.

<44> 이에, 본 발명자들은 β ig-h3 단백질 또는 β ig-h3 단백질의 fas-1 도메인의 보존적 서열인 YH 모티프를 포함하는 웨타이드가 α v β 3 인테그린과 작용하여 세포부착 및 세포이동을 매개하므로, YH 모티프를 포함하는 웨타이드를 이용하여 세포부착 및 세포이동을 억제함으로써 혈관신생을 억제할 수 있음을 확인하고, 상기 웨타이드를 혈관신생 억제제로 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<45> 본 발명의 목적은 보존적 서열인 YH 모티프를 포함하는 웨타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제를 제공하는 것이다.

<46> 또한, 본 발명의 목적은 상기 혈관신생 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제, 관절염 치료제, 건선 치료제, 당뇨성 안질환 치료제, 동맥경화 치료제 및 염증 반응 치료제를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <47> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 fas-1 도메인의 티로신-히스티딘 아미노산 서열(이하, 'YH 모티프'라 칭함)을 포함하는 팝타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(angiogenesis) 억제제를 제공한다.
- <48> 또한, 본 발명은 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제, 관절염 치료제, 건선 치료제, 당뇨성 안질환 치료제, 동맥경화 치료제 및 염증 반응 치료제를 제공한다.
- <49> 본 발명의 팝타이드에 있어서, "YH 모티프"는 섬유아세포(fibroblast) 부착을 매개하는 fas-1 도메인에서 밝혀진 모티프로서(Kim, J-E. et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 46159-46165, 2002), 보존적인 서열로서 티로신 및 히스티딘 잔기를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 팝타이드이다.
- <50> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <51> 본 발명은 fas-1 도메인의 티로신-히스티딘 아미노산 서열(YH 모티프)을 포함하는 팝타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(angiogenesis) 억제제를 제공한다.
- <52> 이때, 상기 YH 모티프를 포함하는 팝타이드는 (I, D, E 또는 K)-(E, A 또는 Q)-L-(L, R 또는 A)-(N, D 또는 S)-(A, L, K 또는 I)-(L 또는 Y)-(R, N, L 또는 K)-(Y 또는 N)-H-(M, I 또는 G)-(V, L, Q 또는 G)-(G, K, T 또는 D)-(R, S, L 또는 E)-(R, A, E 또는 I)-(V, M, T 또는 L)-(L, C 또는 V)-(T, A, G 또는 S) 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하다.

<53> 또한, 상기 YH 모티프를 포함하는 웨타이드는 여러 단백질에 존재하는 fas-1 도메인에서 매우 보존된 모티프로서, 서열번호 1 내지 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, β ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인 중 서열번호 5(548-614번 아미노산 절편)로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 더욱 바람직하고, β ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인 중 서열번호 6(502-632번 아미노산 절편)으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 가장 바람직하다.

<54> 본 발명자들은 β ig-h3가 상피(epithelial) 세포 부착을 유도하는 α 3 β 1 인테그린-작용 모티프를 갖고 있고(Kim, J-E. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 30907-30915, 2000), 섬유아세포(fibroblast)의 세포부착을 유도하는 4개의 α v β 5 인테그린-작용 모티프가 있다는 것을 보고한 바 있다(Kim, J-E. et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 46159-46165, 2002). 이에, 본 발명에서는 β ig-h3 및 β ig-h3의 각 도메인이 내피세포(endothelial cell)에 부착할 때의 역할 및 β ig-h3에 의해 내피세포가 부착하는데 관여하는 인테그린 수용체를 조사하였다. 아울러, 상기 인테그린 수용체와 작용하는 β ig-h3 내의 모티프를 찾기 위하여 β ig-h3에 대한 결실 변이체를 제조한 후, 세포 부착에 관여하는 절편을 조사하였다.

<55> 그 결과, β ig-h3 및 fas-1 도메인은 동일한 활성으로 내피세포 부착을 매개하고(도 2a 참조), α v β 3 인테그린이 β ig-h3과 상호작용하여 내피세포 부착에 관여하며(도 2b, 도 2c 및 도 2d 참조), 또한 서열번호 5로 기재되는 fas-1 도메인의 548-614번 아미노산 절편이 세포 부착과 관련된 활성을 나타냄을 확인하였다(도 3a 및 도 3b 참조).

<56> 또한, 본 발명자들은 서열번호 5로 기재되는 상기 548-614번 아미노산 절편이 α v β 5 인테그린과 결합하는 것으로 보여지는 YH 모티프를 포함함을 보고한 바 있다(Kim, J-E. et al.,

J. Biol. Chem., 277, 46159–46165, 2002). 상기와 같은 내용을 바탕으로 YH 모티프가 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 상호작용하여 내피세포 부착을 매개할 것인지 여부를 확인한 결과, 본 발명의 YH 모티프는 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 작용하여 내피세포 부착과 관련된 활성을 나타냄을 확인하였다(도 3b 참조).

<57> 또한, YH 모티프를 포함하는 웨بت아이드를 합성한 후, 상기 웨بت아이드가 내피세포 부착에 미치는 영향을 알아본 결과, β ig-h3에 의해 매개되는 내피세포 부착이 서열번호 1 내지 서열 번호 4로 기재되는 YH 모티프에 의해 농도 의존적으로 저해되었다(도 3c 참조). 이는 β ig-h3의 $\alpha v\beta 3$ 인테그린을 통한 내피세포 부착이 YH 모티프에 의한 것임을 나타내는 것으로서 YH 모티프를 첨가할 때 상기 내피세포 부착이 억제됨을 나타낸다.

<58> 또한, $\beta 3$ 인테그린을 생성하지 못하는 HEK 293 세포를 $\beta 3$ 인테그린 발현벡터로 형질전환시켜서 β ig-h3에 의한 세포부착의 변화를 조사하였다. 그 결과, β ig-h3는 $\beta 3$ 인테그린 발현벡터로 형질전환된 HEK 293 세포(이하, ' $\beta 3/293$ 세포'로 약칭)의 부착을 매개하고(도 4a 참조), $\alpha v\beta 3$ 인테그린이 β ig-h3과 상호작용하여 상기 $\beta 3/293$ 세포의 부착에 관여하며(도 4b 참조), β ig-h3에 의해 매개되는 $\beta 3/293$ 세포 부착이 서열번호 1 내지 서열번호 4로 기재되는 YH 모티프에 의해 농도 의존적으로 저해되었다(도 4c 참조). 이는 β ig-h3의 $\alpha v\beta 3$ 인테그린을 통한 $\beta 3/293$ 세포 부착이 YH 모티프에 의한 것임을 직접적으로 나타낸다.

<59> 본 발명에서는 세포 부착뿐만 아니라 내피세포 이동에서도 YH 모티프가 관여하는지 알아보았고, 그 결과 YH 모티프는 β ig-h3에 의해 촉진되는 내피세포 이동을 저해함을 확인하였다(

도 5a 및 5b 참조). 상기 결과로부터 β ig-h3의 YH 모티프가 $\alpha v\beta 3$ 인테그린을 통한 내피세포 이동을 막개하므로, 상기 펩타이드를 첨가하면 내피세포 이동이 억제됨을 알 수 있다.

<60> $\alpha v\beta 3$ 인테그린은 혈관신생에서 중요한 역할을 하는 인테그린으로 알려져 있다 (Eliceiri, B.P. and Cheresh, D.A., *Cancer J.*, 6, S245-249, 2000). 따라서, $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 상호 작용하는 모티프 및 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 상호 작용하여 세포 이동을 저해하는 펩타이드는 혈관신생에서 중요한 역할을 한다는 것을 추측할 수 있다. 이에, 본 발명에서는 YH 모티프가 혈관신생을 저해하는지 알아보기 위하여 마트리젤을 이용한 혈관신생 저해를 조사해 본 결과, 시험관내 조건(*in vitro*)뿐만 아니라 생체 내 조건(*in vivo*)에서도 YH 모티프에 의하여 혈관신생이 효과적으로 저해됨을 확인하였다(도 6 및 도 7 참조).

<61> 또한, 본 발명은 상기 혈관신생 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제, 관절염 치료제, 건선 치료제, 당뇨성 안질환 치료제, 동맥경화 치료제 및 염증 반응 치료제를 제공한다.

<62> 혈관신생은 암의 성장과 전이에 필수적인 단계로 알려져 있으며, 암 조직의 혈관신생이 발달하면 할수록 다른 조직으로의 전이가 일어날 수 있는 확률이 높다고 보고되고 있으므로 (Weidner, N. et al., *N. Engl. J. Med.*, 324, 1-8, 1991), 암세포의 전이 예방 및 치료를 위해서는 혈관신생을 억제하는 것이 필요하다. 또한, 관절염은 관절염의 진행 과정에서 활액강에 생긴 만성염증이 혈관신생을 유도하며, 새로운 모세혈관이 관절을 침습하여 연골이 손상되는 것이 특징으로 관절 내로의 신생 혈관의 형성이 중요한 병리기전으로 작용한다고 보고되고 있다(Colville-Nash, P.R.

et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 51, 919-925, 1992; Eisenstein, R., *Pharmacol. Ther.*, 49, 1-19, 1991). 따라서, 관절염의 진행 방지와 치료를 위하여 혈관신생을 억제하는 것이 필요하다. 아울러, 건선은 신생혈관의 형성과 이로 인한 혈관 투과성의 증가로 호중구 등의 면역세포들의 침윤이 병의 악화에 중요하다고 알려져 있으므로(Bhushan, M. 141, 1054-1060, 1999), 건선의 치료를 위해서는 혈관신생을 억제하는 것이 필요하다. 또한, 당뇨성 안질환은 혈관 신생이 망막의 내면과 후유리체막을 따라 퍼지면서 유리체 내로 혈관이 침입하는 등 급속한 혈관신생의 진행에 의하여 초래되는 질환이라고 보고되고 있으므로(Favard, C. et al., *Diabetes, Metab.*, 22, 268-273, 1996), 당뇨성 안질환의 예방 및 치료를 위해서는 혈관신생을 억제하는 것이 필요하다. 또한, 동맥 경화증은 죽종 내로의 혈관신생이 혈관벽을 약화시키는 것에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으므로(Hoshiga, M. 77, 1129-1135, 1995; Kahlon, R. et al., *Can. J. Cardiol.*, 8, 60-64, 1992; George, S.J., *Curr. Opin. Lipidol.*, 9, 413-423, 1998), 동맥경화와 같은 합병증 예방을 위해서는 혈관신생을 억제하는 것이 필요하다. 또한, 염증이란 혈류의 증가, 혈관벽의 투과성 증가, 백혈구의 침윤 등 모든 변화에 혈관 신생이 원인과 결과로 일어난다고 알려져 있으므로(Jackson, J. R. et al., *FASEB J.*, 11, 457-465, 1997), 염증 반응을 치료하기 위해서는 혈관신생을 억제하는 것이 필요하다.

<63> YH 모티프는 혈청 또는 성장 인자(bFGF 또는 VEGF) 존재하에서 내피세포 성장에 영향을 미치지 않으므로 세포 증식과는 관련이 없으며, 이와 같은 사실 및 상기 증거를 통하여 YH 모티프가 명확하게 혈관신생 억제 활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 YH 모티프는 혈관신생을 억제하는데 유용하게 사용할 수 있으며, 이는 혈관신생과 관련된 질병인 암, 관절

염, 건선, 당뇨성 퇴행성안질환, 동맥경화 및 염증 반응의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

<64> 본 발명의 보존적 서열로서 YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제는 임상투여시에 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

<65> 즉, 본 발명의 펩타이드는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 혼탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<66> 또한, 상기 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 혼용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 억제제의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르빅산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 칠레이팅 물질(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

<67> 본 발명의 혈관신생 억제제에 있어서, 상기 펩타이드의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할

치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 혈관신생 억제제는 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 β ig-h3 재조합 단백질 또는 상기 단백질의 일부 도메인은 1회 투여시 10 μg 내지 10 mg의 유효용량으로 하루에 수차례 반복 투여될 수 있다. 그러나, 상기 웹타이드의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수 뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 웹타이드의 혈관신생 억제제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

<68> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<69> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정 되는 것은 아니다.

<70> <실시예 1> 세포의 배양

<71> 클로네틱스(Clonetics, San Diego, CA)에서 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells) 세포를 구입하였다. 상기 세포주를 2% FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함하는 EGM 배지 (Clonetics, San Diego, CA)에서 37°C, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다.

<72> HEK293(Human embryonic kidney) 세포는 ATCC(카탈로그 No. CRL 1573)로부터 구입하였다.
· pcDNA3 벡터 및 인간 인테그린 β 3 발현 벡터를 상기 HEK293 세포주(각각 'pc/293 세포', '

β 3/293 세포'로 명명)에 안정하게 감염시켜 10% FBS 및 스트렙토마이신(streptomycin)과 페니실린(penicillin)을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다.

<73> <실시예 2> 재조합 β ig-h3 단백질의 발현 및 정제

<74> 본 발명자들은 이전에 β ig-h3 및 β ig-h3의 fas-1 도메인을 포함하는 재조합 단백질에 대하여 보고한 바 있으며(대한민국특허출원 공개번호 제2001-104177호), 이와 동일한 방법으로 재조합 단백질을 제조하였다.

<75> 구체적으로, β ig-h3 재조합 단백질 His- β -b는 β ig-H3 cDNA로부터 아미노 말단부분이 일부 결실된 *Asp718 - Bgl*II 단편을 pET-29 β 의 *EcoRV*와 *EcoRI* 부위에 삽입하여 제조한 pHis- β -b를 이용하여 발현하였으며, β ig-h3의 일부 도메인만을 포함하는 각각의 재조합 단백질은 아미노산 서열 129번부터 241번까지, 237번부터 377번까지, 368번부터 506번까지, 498번부터 637번까지 해당하는 β ig-h3 cDNA 각각의 절편들을 PCR에 의해 증폭시킨 후, 벡터 pET-29b(+)(Novagen; Madison, WI)의 *EcoRV* 및 *Xba*I 위치에 클로닝하여 각각 p β ig-h3 D-I, p β ig-h3 D-II, p β ig-h3 D-III 및 p β ig-h3 D-IV로 명명한 발현벡터를 이용하여 제조하였다(도 1).

<76> 상기 벡터들을 각각 형질전환시킨 대장균 세포주(*E.coli* BL 21 DE3)는 50 μ g/ml 카나마이신(kanamycin)을 포함한 37°C LB 배양액에서, 595 nm 흡광도가 0.5~0.6까지 배양하고, 1 mM IPTG(isopropyl- β -D-(β -thiogalactopyranoside)로 37°C에서 3시간 동안 재조합 β ig-h3 단백질의 발현을 유도하여, 용해 완충용액(50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT)에 재부유시키고 초음파로 분쇄하였다. 봉입체 형태로

발현된 단백질들은 8 M 요산 변성완충액으로 용해시켰고, 변성된 단백질들은 Ni-NTA 수지(resin, Qiagen)를 이용하여 정제하였다. 재조합 단백질을 200 mM 이미다졸(imidazole) 용액에서 용리한 다음, 50 mM 염화나트륨을 포함한 20 mM 트리스 염산 완충액 내에서 고농도에서 저농도 요산으로 차례로 투석하여 정제하였다. 상기 발현 정제된 재조합 단백질을 SDS-PAGE에 의하여 확인하였다. β ig-h3 D-I, β ig-h3 D-II, β ig-h3 D-III 및 β ig-h3 D-IV 재조합 단백질들은 4개의 도메인을 모두 포함하고 있는 β ig-h3 His- β -b 재조합 단백질과는 달리 모두 수용성으로 합성되어 변성단계를 거치지 않아도 되며, 많은 양을 쉽게 얻을 수가 있었다.

<77> 상기 발현벡터 pHis- β -b, p β ig-h3 D-II 및 p β ig-h3 D-IV에 의해 형질전환된 대장균 형질전환체는 각각 *E. coli* BL21/His- β -b, *E. coli* BL21/His β -g 및 *E. coli* BL21/His β -e로 명명하였으며, 2000년 4월25일자로 생명공학 연구소 유전자 은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 18008P, KCTC 18010P 및 KCTC 18009P).

<78> <실시예 3> β ig-h3 및 fas-1 도메인에 대한 내피세포(endothelial cell)의 부착에 관여하는 수용체의 동정

<79> <3-1> 세포 부착 분석

<80> 본 발명자들은 β ig-h3 및 β ig-h3의 각 도메인이 내피세포의 부착에 관여하는지 알아보았다.

<81> 세포 부착 분석은 종래의 기술에 따라 수행하였다(Kim, J-E.

et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 46159–46165, 2002). 구체적으로, 바닥이 평평한 96웰 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 플레이트(Costar, Corning Inc., NY)에 상기 실시 예 2에서 제조한 10 µg/ml의 재조합 β Ig-h3, 1번째 fas-1 도메인(D-I), 2번째 fas-1 도메인(D-II), 3번째 fas-1 도메인(D-III) 또는 4번째 fas-1 도메인(D-IV)을 첨가한 후 4°C에서 밤새 배양하여 코팅하였고, 그 후 2% BSA를 포함하는 PBS(phosphate-buffered saline) 용액으로 실온에서 1시간 동안 블록시켰다. 3×10^5 세포/ml의 농도로 HUVEC 세포를 배양 배지에서 부유시킨 후, 0.1 ml의 세포 부유물을 코팅된 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 37°C에서 30분간 배양시킨 후 부착되지 않은 세포들을 PBS로 한차례 세척하여 제거하였다. 부착된 세포는 3.75 mM p-니트로페닐-N-아세틸 β-D-글리코사미나이드(glycosaminide) 및 0.25% 트리톤 X-100을 포함하는 pH 5.0의 50 mM 구연산(citrate) 버퍼를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다.

<82> 5 mM EDTA를 포함하는 pH 10.4의 50 mM의 글리신(glycine) 버퍼를 첨가함으로써 효소의 활성을 차단시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Bio-Rad model 550 microplate reader). 이때, 세포가 많이 붙어있을수록, 즉 세포의 수가 많을수록 효소의 활성도가 높게 측정된다.

<83> 그 결과, β Ig-h3는 HUVEC 세포 부착을 매개하고, β Ig-h3의 각각의 fas-1 도메인들도 동일한 활성으로 내피세포 부착을 매개하는 것을 확인하였다(도 2a).

<84> <3-2> 내피세포의 부착에 관여하는 수용체의 동정 1

<85> 본 발명자들은 β ig-h3에 의해 내피세포가 부착하는데 관여하는 인테그린 수용체를 동정하기 위하여, 여러 가지 인테그린 기능블록 항체(function blocking antibodies)를 사용하여 세포부착 저해 분석(Inhibition Assay)을 수행하였다.

<86> 구체적으로, β ig-h3에 대한 수용체를 동정하기 위하여, 여러 타입의 인테그린에 특이적인 단일클론 항체(Chemicon, International Inc, Temecula, CA) $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 0.1 ml 의 배양 용액에서 3×10^5 세포/ ml 농도의 HUVEC 세포와 37°C 에서 30분간 각각 전배양시켰다. 전배양된 세포를 재조합 β ig-h3로 미리 코팅된 플레이트로 전달한 후 37°C 에서 30분간 추가로 배양하였다. 부착된 세포는 실시예 <3-1>에 기술한 바와 같이 정량하였다. 인테그린 서브유닛(subunit)에 대한 기능을 블록하는(function-blocking) 단일클론 항체는 다음과 같다: α 3(P1B5), α 5(P1D6), α v(P3G8), β 1(6S6), β 3 (B3A), α v β 3(LM609), α v β 5(P1F6).

<87> 그 결과, β ig-h3에 대한 HUVEC 세포 부착은 α v β 3 및 β 3에 대한 항체에 의해 특이적으로 저해되었고, α v β 5, α 3, α 5, α v, 및 β 1에 대한 항체에 의해서는 세포부착이 저해되지 않았다(도 2b).

<88> <3-3> 내피세포의 부착에 관여하는 수용체의 동정 2

<89> 본 발명자들은 β ig-h3의 각각의 fas-1 도메인에 대한 인테그린 수용체를 동정하기 위하여, β ig-h3로 미리 코팅된 플레이트 대신에 β ig-h3의 각각의 fas-1 도메인으로 코팅된 플레이트를 사용하여 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 세포부착 저해 분석(Inhibition Assay)을 수행하였다.

<90> 그 결과, 각각의 fas-1 도메인에 대한 HUVEC 세포 부착은 $\alpha v \beta 5$ 에 대한 항체에 의해서는 저해받지 않았으나, $\alpha v \beta 3$ 에 대한 항체에 의해 특이적으로 저해되는 것을 확인하였다(도 2c). 상기 결과로부터 각각의 fas-1 도메인은 $\alpha v \beta 3$ 인테그린을 통하여 내피세포 부착을 매개하는 모티프를 갖고 있다는 것을 알 수 있었다.

<91> <3-4> 내피세포의 부착에 관여하는 수용체의 동정 3

<92> 먼저, 마이레 등의 방법으로 β ig-h3에 바이오틴(biotin)을 붙인(labeling) 바이오틴- β ig-h3 단백질을 이용하여 내피세포의 부착에 β ig-h3이 관여하는지를 확인하였다(Maile, L.A. et al., J. Biol. Chem., 277, 1800–1805, 2002). 구체적으로, 1×10^5 세포/ml 농도의 HUVEC 세포 0.1 ml와 각각 1×10^{-10} , 1×10^{-9} 및 5×10^{-9} μM 농도의 바이오틴- β ig-h3를 4°C에서 5시간 동안 배양시킨 후, PBS 용액으로 한 차례 세척하였다. 다음으로, 세포를 파괴하여 상기 단백질을 SDS-전기영동한 후, 스트렙타비딘(streptavidin) 항체로 웨스턴-면역블러팅(western-immunoblotting)으로 HUVEC 세포에 부착된 바이오틴- β ig-h3를 정량하였다. 내부 대조군(internal control)으로 β -튜블린 단백질을 웨스턴 블러팅하여 동일량의 단백질을 검사하였음을 확인하였다. 그 결과, 바이오틴- β ig-h3는 농도 의존적으로 HUVEC 내피세포에 결합함을 확인하였다(도 2d의 A).

<93> 상기 실시예 <3-2> 및 <3-3>를 통하여, 본 발명자들은 β ig-h3, β ig-h3의 각각의 fas-1 도메인 및 fas-1 도메인의 보존적 서열로서 YH 모티프가 $\alpha v \beta 3$ 인테그린과 상호작용하여 내피

세포의 부착을 매개함을 확인하였다. 아울러, 본 발명자들은 β ig-h3의 각각의 fas-1 도메인에 존재하는 YH 모티프가 섬유아세포(fibroblast)의 $\alpha v\beta 5$ 인테그린과 상호 작용하여 세포부착을 매개함이 보고한 바 있다(Kim, J-E. et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 46159-46165, 2002). 이와 같이, YH 모티프는 $\alpha v\beta 3$ 및 $\alpha v\beta 5$ 인테그린과 상호작용함을 알 수 있고, HUVEC 내피세포는 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ 인테그린을 모두 발현함에도 불구하고 $\alpha v\beta 3$ 인테그린만이 특이적으로 β ig-h3와의 부착에 관여하는지 여부를 다시 한번 알아보았다.

<94> 구체적으로, 1×10^5 세포/ml 농도의 HUVEC 세포 0.1 ml를 각각 2 및 5 μ g의 $\alpha v\beta 3$ 또는 $\alpha v\beta 5$ 인테그린 기능블록 항체와 37°C에서 30분 동안 각각 전배양시켰다. 상기 전배양된 세포를 바이오틴- β ig-h3과 4°C에서 5시간 동안 배양시킨 후, PBS 용액으로 한 차례 세척하였다. 다음으로, 세포를 파괴하여 상기 단백질을 SDS-전기영동한 후, 스트랩타비던 항체로 웨스턴-면역블랏팅으로 HUVEC 세포에 결합된 바이오틴- β ig-h3를 정량하였다.

<95> 그 결과, 바이오틴- β ig-h3는 $\alpha v\beta 5$ 인테그린 기능블록 항체에 의해서는 저해되지 않았으나, $\alpha v\beta 3$ 인테그린 기능블록 항체에 의해서는 농도 의존적으로 내피세포에의 결합이 저해되는 것을 확인하였다(도 2d의 B).

<96> 상기 결과를 통하여, β ig-h3의 YH 모티프는 HUVEC 세포의 $\alpha v\beta 3$ 또는 $\alpha v\beta 5$ 인테그린에 다른 친화력을 가지고 있음을 알 수 있고, 이로 인하여 β ig-h3의 부착에 $\alpha v\beta 3$ 인테그린 기능블록 항체만이 저해작용을 나타냄을 확인할 수 있었다.

<97> <실시예 4> 내피세포 부착에서 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 작용하는 β ig-h3 내의 모티프 동정

<98> <4-1> 결실 변이체 및 YH 모티프 변이체에 의한 $\alpha v\beta 3$ 인테그린-작용 모티프의 동정

<99> 본 발명자들은 β ig-h3 또는 fas-1 도메인이 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 작용하여 내피세포 부착을 유도할 때 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 작용하는 모티프를 동정하기 위하여, fas-1 도메인의 결실 변이체와 YH 모티프 내의 아미노산을 치환시킨 변이체를 제조하여 YH 모티프가 $\alpha v\beta 3$ 인테그린과 작용하는 모티프인지를 알아보았다.

<100> 이를 위하여, 본 발명자들은 종래의 기술(Kim, J-E. et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 46159-46165, 2002)과 동일한 방법을 사용하여 내피세포 부착 활성을 유지하는 가장 작은 절편을 찾아내었다. 구체적으로, 본 발명자들은 네 번째 fas-1 도메인의 재조합 단백질인 $\Delta H1H2(6)$ 를 제조하였다(도 3a 및 도 3b). 이를 위하여 $\Delta H1$, $\Delta H2$, $\Delta H2(6)$ 및 $\Delta H1H2$ 을 제조한 후에, $\Delta H1H2(6)$ 를 제조하였다(도 3a). 상기에서, $\Delta H1$ 및 $\Delta H2$ 는 각각 매우 보존적인 서열인 H1 및 H2가 결실된 재조합 단백질을 나타내며, $\Delta(6)$ 는 $\alpha 3\beta 1$ 인테그린과 상호작용하는 모티프인 서열번호 5로 기재되는 EPDIM 서열을 포함한 C-말단 절편이 결실된 재조합 단백질을 나타낸다. 상기 재조합 단백질을 제조하기 위하여, 먼저 β ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인의 498-637번 아미노산을 코딩하는 β igh3 D-IV cDNA를 사용하여 결실 돌연변이 구조체를 클로닝하였다(Kim, J-E. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 30907-30915, 2000). 서열번호 5로 기재되는 548-614번 아미노산을 코딩하는 β ig-h3 cDNA의 절편은 β igh3 D-IV cDNA를 주형으로 PCR을 실시하여 제조하였으며, pET-29b(+) 벡터(Novagen; Madison, WI)의 *Eco*RV/*Xba*I 부위에 클로닝한 후 $\Delta H1H2(6)$ 라 명명하였다.

<101> β igh3 D-IV의 4번째 fas-1 도메인의 보존적 서열인 티로신 및 히스티딘 잔기와 그 주위의 이소루신과 루신을 알라닌 또는 세린으로 치환하기 위하여, 이전에 기술된 방법에 따라 β igh3 D-IV cDNA를 주형으로 두 단계 PCR을 실시하여 서열번호 7로 기재되는 YH 모티프 변이체

(D-IV-LAAR)를 제조하였다(Kim, I-S. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 4003-4013, 1996). 돌연변이 여부를 DNA 시퀀싱에 의하여 확인하였다. 이전에 기술된 방법에 따라 재조합 β ig-h3를 발현한 후 정제하였다(Kim, J-E. et al., *J. Cell. Biochem.*, 77, 169-178, 2000).

<102> 다음으로 본 발명자들은 Δ H1H2(6) 및 YH 모티프 변이체(D-IV-LAAR)의 세포 부착 활성을 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 수행하였다. 대조군으로는 4번째 fas-1 도메인(D-IV)을 사용하였다.

<103> 그 결과, 서열번호 6으로 기재되는 4번째 fas-1 도메인(D-IV) 및 서열번호 5로 기재되는 Δ H1H2(6) 절편은 정상적으로 내피세포 부착을 매개하는 것으로 나타나, 세포 부착에 관여하는 모티프는 서열번호 5로 기재되는 548-614번 아미노산 절편 내에 존재한다는 것을 확인하였다. 이 절편 내에는 YH 모티프가 존재하고, 따라서 YH 모티프의 중요한 일부 아미노산이 치환된 서열번호 7로 기재되는 YH 모티프 변이체(D-IV-LAAR)는 내피세포 부착을 매개하지 못함을 확인하였다(도 3b).

<104> <4-2> YH18 웨타이드에 의한 내피세포 부착 억제 분석

105> 본 발명자들은 YH 모티프가 내피세포 부착에 관여한다는 것을 확인하기 위하여, fas-1 도메인의 YH18 합성 웨타이드를 첨가하였을 때 내피세포 부착이 억제되는지 알아보았다.

106> 구체적으로, YH18 웨타이드는 β ig-h3의 모든 fas-1 도메인에 보존적인 서열로서 티로신 및 히스티딘 잔기와 상기 티로신 및 히스티딘 잔기 근처에 몇 개의 보존된 루신 및 이소루신 잔기를 포함하는 18개의 아미노산 잔기로 이루어진 웨타이드로서 앤이진(AnyGen Co. Ltd, 광주

, 대한민국)사에 의뢰하여 합성하였고, 단백질 기질이 코팅된 웰에서 세포가 부착하는 것을 합성 펩타이드가 저해하는 능력이 있는지 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 테스트해 보았다. YH18 합성 펩타이드는 fas-1 도메인의 YH18 펩타이드를 나타내는 것으로, 1번째 fas-1 도메인 내의 서열번호 1로 기재되는 YH18 도메인(D-I YH18), 2번째 fas-1 도메인 내의 서열번호 2로 기재되는 YH18 도메인(D-II YH18), 3번째 fas-1 도메인 내의 서열번호 3으로 기재되는 YH18 도메인(D-III YH18) 및 4번째 fas-1 도메인 내의 서열번호 4로 기재되는 YH18 도메인(D-IV YH18)을 사용하였다. 또한 서열번호 8로 기재되는 YH18-con. 펩타이드를 YH18에 대한 대조군으로 사용하였다.

<107> 그 결과, β Ig-h3에 의해 매개되는 내피세포 부착은 서열번호 1 내지 서열번호 4로 기재되는 YH18 모티프에 의해 농도 의존적으로 저해된다는 것을 알 수 있었다(도 3c).

<108> 상기 결과로부터 $\alpha v \beta 3$ 인테그린을 통한 β Ig-h3에 의해 매개되는 내피세포 부착은 β Ig-h3 내의 YH 모티프가 관여한다는 것을 확인하였다.

<109> <실시예 5> β Ig-h3에 대한 기능적 수용체의 동정

<110> <5-1> 인테그린 발현 세포에 의한 기능적 수용체의 동정

<111> 본 발명자들은 β Ig-h3가 $\alpha v \beta 3$ 인테그린을 통하여 내피세포 부착을 매개한다는 것을 다시 한번 확인하기 위하여, 인간 $\beta 3$ 인테그린에 대한 발현 벡터로 안정적으로 형질전환시킨 HEK 293 세포를 사용하여 추가로 실험을 실시하였다. 대조군으로는 pcDNA3로 형질전환된 HEK 293 세포를 사용하여 세포부착 분석을 수행하였다.

<112> 구체적으로, 인간 태반 poly(A)⁺ RNA를 주형으로 역전사 PCR을 수행하여 2.4 kb의 β 3 cDNA를 제조하였다(Chandrika, S.K. et al., J. Biol. Chem., 272, 16390-16397, 1997). β 3 cDNA를 HindIII/Xba I 으로 절단한 후, 상기 절단 단편을 pcDNA3 벡터(Invitrogen 사)의 HindIII/Xba I 부위에 클로닝한 후, 상기 벡터를 β 3.pcDNA3으로 명명하였다. 이와 같이 제조된 β 3.pcDNA3 벡터와 pcDNA3 벡터 각각의 DNA(1 μ g)로 HEK293 세포(ATCC, 카탈로그 No. CRL 1573)를 리포벡타민(Gibco사)을 이용하여 형질전환시켰다. 이때, 상기 벡터들은 모두 G418 선택제를 포함하고 있으므로, 1 mg/ml 농도의 G418로 선별하여 안정적인 형질전환체를 제조하고, 이들을 각각 β 3/293 세포, pc/293 세포로 명명하였다. 상기 형질전환체를 이용하여 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 세포부착 분석을 수행하였다.

<113> 그 결과, β 3/293 세포는 β ig-h3에 강하게 부착하는 결과를 보였으나, pc/293 세포는 BSA를 코팅한 것과 비슷한 결과를 보여 β ig-h3에 부착하지 못하는 것을 확인하였다(도 4a). 이러한 결과는 pc/293 세포는 α v를 생성하기는 하지만 β 3를 합성하지 못하므로 β ig-h3에 부착하지 못하지만, β 3/293 세포는 β 3를 발현시킬 수 있어 α v β 3 인테그린을 생성할 수 있기 때문이다.

<114> <5-2> 기능블록 항체를 사용한 기능적 수용체의 동정

<115> 본 발명자들은 상기 실시예 <5-1>의 β 3/293 세포를 사용하고, 인테그린에 대한 기능블록 항체를 사용하여 β ig-h3가 α v β 3 인테그린을 통하여 내피세포 부착을 매개하는지 여부를 조사하였다. 기능블록 항체를 이용한 실험은 상기 실시예 <3-2>와 동일하게 수행하였다.

<116> 그 결과, β ig-h3에 대한 β 3/293 세포의 부착은 α v β 3 인테그린에 대한 기능블록 항체에 의해 특이적으로 저해되었고, α v β 5에 대한 항체에 의해서는 세포부착이 저해되지 않았다(도 4b).

<117> <5-3> YH18 펩타이드에 의한 세포부착 저해 분석

<118> 본 발명자들은 YH18 펩타이드에 의해 β 3/293 세포 부착이 저해되는지를 알아보았다. YH18 펩타이드에 의한 세포부착 저해 분석은 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법으로 수행하였다.

<119> 그 결과, 각각의 fas-1 도메인으로부터 유래한 서열번호 1 내지 서열번호 4로 기재되는 YH18 펩타이드는 β 3/293 세포가 β ig-h3에 부착하는 것을 저해한다는 것을 확인하였다(도 4c).

<120> 상기 결과로부터 각각의 β ig-h3의 YH 모티프는 α v β 3 인테그린과의 상호작용을 통하여 내피세포 부착을 막개하고, 상기 YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 첨가하는 경우에 상기 펩타이드가 α v β 3 인테그린과의 상호작용하여 내피세포 부착을 저해하는 것을 알 수 있었다.

<121> <실시예 6> YH 모티프의 내피세포 이동 저해 분석

<122> <6-1> 기능블록 항체에 의한 세포이동 저해 분석

<123> 본 발명자들은 β ig-h3가 내피세포 이동에 관여하는 알아보기 위하여, 세포이동 실험을 수행하였다. 구체적으로, 세포이동 실험은 트랜스웰(transwell) 플레이트(포어 사이즈 8 μ m,

Costar, Cambridge, MA)를 사용하여 실시하였다. 트랜스웰의 밑표면을 각각의 β Ig-h3 용액 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)으로 4°C 에 밤새 반응시키고, 그 후 2% BSA를 포함하는 PBS 용액으로 실온에서 1시간 동안 블록시켰다. 3×10^5 세포/ mL 의 농도로 HUVEC 세포를 배양 배지에서 부유시킨 후, 0.1 mL 의 세포 부유물을 항- $\alpha v\beta 3$ (LM609) 또는 $\alpha v\beta 5$ (P1F6)를 첨가하여 37°C 에서 30분 동안 각각 전배양시켰다. 다음으로 세포를 37°C 에서 6-8시간 동안 이동하게 두었다. 항체에 대한 대조군으로는 IgG를 사용하였다.

<124> 코튼 면봉으로 필터의 윗부분에서 세포를 제거함으로써 세포이동을 종결하였고, 필터를 8% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 고정하고, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하였다. 세포이동은 광학현미경으로 관찰하였고, HPF(Microscopic high power fields, x 200) 하에서 임의로 선택된 9군데에서 세포수를 측정하였다.

<125> 그 결과, 상기 트랜스웰 시스템에서 내피세포 이동은 β Ig-h3의 코팅에 의하여 촉진되고, 상기 효과는 $\alpha v\beta 3$ 인테그린에 대한 항체에 의하여 저해되었으나 $\alpha v\beta 5$ 인테그린에 대한 항체에 의해서는 저해되지 않는다는 것을 확인하였다(도 5a의 A 및 도 5a의 B).

<126> <6-2> YH18 펫타이드에 의한 세포이동 저해 분석

<127> 본 발명자들은 YH18 펫타이드에 의해서 내피세포 이동이 저해되는지 알아보았다. 서열 번호 2로 기재되는 YH18 펫타이드 또는 서열번호 8로 기재되는 YH18-con. 펫타이드를 첨가하여 상기 실시예 <6-1>과 동일하게 실험을 수행하였다.

<128> 그 결과, YH18 펩타이드는 β Ig-h3에 의하여 촉진되는 내피세포 이동을 저해한다는 것을 알 수 있었다(도 5b의 A 및 도 5b의 B). 상기 결과로부터 β Ig-h3의 YH 모티프는 α v β 3 인데그린을 통한 내피세포 이동을 막개하고, YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 첨가한 경우에 상기 펩타이드가 α v β 3 인데그린과 상호작용하여 내피세포 이동을 저해한다는 것을 확인하였다.

<129> <실시 예 7> YH18 펩타이드에 의한 혈관신생 저해 분석

<130> <7-1> 내피 튜브 형성 분석(Endothelial tube formation assay)

<131> 본 발명자들은 YH18 펩타이드가 혈관신생을 저해하는지 알아보기 위하여, 내피 튜브 형성에 미치는 영향을 분석하였다. 구체적으로, 마트리겔(Matrigel, Chemicon, International Inc, Temecula, CA)을 96웰 플레이트의 각 웰에 100 μ l씩 첨가하여 중합시켰다. HUVEC 세포를 3×10^5 세포/ mL 의 농도로 배양 배지에서 부유시킨 후, 0.1 mL 의 세포 부유물을 마트리겔이 코팅된 각 웰에 첨가하였다. 이때, 서열번호 2로 기재되는 YH18 펩타이드 500 μM 또는 1 mM 을 함께 첨가하거나 첨가하지 않았다. 세포를 37°C에서 16-18시간 동안 배양한 후, 상기 세포의 사진을 찍고 튜브를 계수하여 평균값을 구하였다.

<132> 그 결과, YH18 펩타이드는 농도 의존적인 방법으로 마트리겔에서 내피 튜브 형성을 선택적으로 저해하였지만, 대조군으로 사용한 펩타이드(YH18-con.)는 내피 튜브 형성을 저해하지 못한다는 것을 확인하였다(도 6의 A 및 도 6의 B).

<133> 상기 결과로부터 YH 모티프를 포함하는 펩타이드는 혈관신생을 저해하는 활성을 갖고 있다는 것을 알 수 있었다.

<134> <7-2> 마트리젤 플러그 분석(Matrigel Plug assay)

<135> 본 발명자들은 상기 실시예 <7-1>의 시험관내 조건(*in vitro*)에서 수행한 YH18 펫타이드의 혈관신생 저해 효과를 생체내 조건(*in vivo*)에서 분석하였다. 구체적으로, 생체내 마트리젤 플러그 분석은 이전의 방법에 따라 수행하였다(Maeshima, Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 23745-23750, 2000). C57/BL6 생쥐는 5 내지 6주령의 수컷으로 효창 과학에서 구입하여 사용하였다. 먼저, 마트리젤(BD Biosciences, MA)을 20 units/ml 혜파린, 150 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor, R&D system, International, Inc), YH18 펫타이드와 혼합하였다. 마트리젤 혼합물을 피하주사하고, 7일 후에 생쥐를 희생하여 마트리젤을 제거한 후 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 상기 플러그를 파라핀에 파묻고, 절단하여 H&E 염색을 수행하였다. 절단한 것을 광학현미경으로 관찰하였고, 혈관의 수를 4-6 HPF(high power fields; x 200)으로 계수하여 평균값을 구하였다. 각각의 그룹은 3 또는 4 마트리젤 플러그로 구성된다.

<136> 그 결과, 대조군으로 사용한 펫타이드(YH18-con.)는 혈관신생을 저해하는 효과가 없었으나, 500 μ M 농도의 YH18 펫타이드를 첨가한 경우에는 혈관의 수가 급격히 감소하고, 1 mM 농도의 YH18 펫타이드를 첨가한 경우에는 혈관신생이 완전히 저해되는 것을 확인하였다(도 7의 상단). 또한, 이를 절단하여 관찰한 경우에도 상기와 같은 결과를 얻을 수 있었다(도 7의 중단 및 도 7의 하단). 상기 결과로부터 YH 모티프를 포함하는 펫타이드 및 그의 유도체는 혈관신생을 저해하는데 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

<137> <적용예 1> 암

<138> 혈관신생은 암의 성장과 전이에 필수적인 단계로 알려져 있으며, 암 조직의 혈관신생이 발달하면 할수록 다른 조직으로의 전이가 일어날 수 있는 확률이 높다고 보고되고 있다 (Weidner, N. et al., *N. Engl. J. Med.*, 324, 1-8, 1991). 혈류를 통한 암 세포의 전이는 이미 생성되어있는 혈관을 통하여 발생하는 경우는 매우 드물며, 혈관신생이 왕성하게 발생하는 부위에서 주로 발생한다. 즉, 불완전한 혈관벽 사이로 암세포가 빠져나가거나, 단백질 분해효소의 작용에 의해 혈관벽의 기저막이 분해될 때 이 사이로 암세포가 빠져나가며, 일부에서는 증식하고 있는 내피세포가 직접 암 세포를 신생혈관내로 이동시켜서 전신적 전이가 발생하게 된다. 따라서, 본 발명의 YH 모티프를 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 억제제는 혈관신생의 억제 효능이 뛰어나므로 다양한 암세포의 전이 예방 및 치료에 대단히 효과적이다.

<139> <적용예 2> 관절염

<140> 관절염이란 관절 내 연골이 파괴되어 관절 운동에 장애를 초래하는 질환으로, 감염성 관절염, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 대퇴골두 무혈성 괴사, 강직성 척추염, 선천성 기형에 의한 관절염 등 여러 종류가 있으나 원인을 불문하고 병이 진행하는 과정에서 활액강에 생긴 만성염증이 혈관신생을 유도한다고 알려져 있으며 새로운 모세혈관이 관절을 침습하여 연골이 손상되는 것이 특징이다. 이때, 종류에 따라 염증반응이 일차적, 이차적으로 생겨 연골을 파괴하여 병의 진행에 중요한 역할을 한다. 이때, 관절 내로의 신생 혈관의 형성이 중요한 병리기전으로 작용한다고 보고되고 있다(Colville-Nash, P.R. et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 51,

919-925, 1992; Eisenstein, R., *Pharmacol. Ther.*, 49, 1-19, 1991). 관절염의 치료는 원인에 따른 치료보다는 통증을 억제하는 것과 염증 현상을 억제하여 관절이나 근육, 그리고 건 등에 파괴속도를 최대한 늦추고 기능 소실을 최소화하는 것을 우선으로 한다. 따라서, 혈관신생을 억제시키는 본 발명의 억제제는 관절염의 진행 방지와 치료에 대단히 효과적이다.

141 <적용 예 3> 건선

142 건선은 구진 및 은백색의 인설을 가지는 원인 미상의 피부질환이다. 대개 악화와 호전이 반복되는 만성질환으로 원인 미상이지만 병리학적 소견상 병변부나 비병변부에서 관찰되는 신생혈관의 형성과 이로 인한 혈관 투과성의 증가로 호중구 등의 면역세포들의 침윤이 병의 악화에 중요하다고 알려져 있다(Bhushan, M. et al., *Br. J. Dermatol.*, 141, 1054-1060, 1999). 따라서, 혈관 신생을 억제시키는 본 발명의 억제제가 건선의 치료에 효과적이다.

143 <적용 예 4> 당뇨성 안질환

144 당뇨성 안질환은 실명을 초래할 수 있는 당뇨병의 주요 합병증의 하나로 혈당조절 정도와는 상관없이 유병기간이 길어지면 발생한다. 최근 당뇨병의 치료법이 향상됨에 따라 당뇨병 환자의 수명이 연장되면서 당뇨망막병증도 병행하여 증가하는 추세에 있다. 따라서, 당뇨망막병증은 서구에서는 물론 우리나라에서도 성인 실명의 가장 큰 원인이 되고 있다. 당뇨망막병증은 망막의 미세순환의 장애로 발생하여 혈관 신생이 망막의 내면과 후유리체막을 따라 퍼지면서 유리체 내로 혈관이 침입하기도 하고 출혈이 일어나기도 하면서 실명을 초래하게 된다. 특히, 당뇨성 망막증과 같은 당뇨성 안질환은 급속한 혈관신생의 진행에 의하여 초래되는 질환

이라고 보고되고 있다(Favard, C. et al., *Diabetes, Metab.*, 22, 268-273, 1996). 따라서, 혈관신생을 억제시키는 본 발명의 억제제가 당뇨성 안질환의 예방 및 치료에 대단히 효과적이다.

<145> <적용 예 5> 동맥경화

<146> 동맥 경화증은 동맥벽이 두꺼워져서 벽의 탄력성이 소실되는 질환들을 의미한다. 세 가지 형태학적 종류가 있는데 중간크기 이상의 동맥에 죽종이 형성되어 생기는 죽상동맥경화가 가장 흔하고 중요한 질환이다. 콜레스테롤과 콜레스테롤 에스터로 구성되어 섬유성 피막에 쌓인 죽종이 동맥의 내면을 덮으면서 동맥벽의 내강이 협소해져 원위부 장기의 혈류를 차단하여 장기의 허혈성 손상을 야기하게 된다. 대동맥에 생긴 경우 침범된 동맥벽을 약화시켜 동맥류와 혈관파열, 혈전을 일으킨다. 이때, 죽종 내로의 혈관신생이 혈관벽을 약화시키는 것에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다(Hoshiga, M. et al., *Circ. Res.*, 77, 1129-1135, 1995; Kahlon, R. et al., *Can. J. Cardiol.*, 8, 60-64, 1992; George, S.J., *Curr. Opin. Lipidol.*, 9, 413-423, 1998). 따라서 혈관신생을 억제시키는 본 발명의 억제제가 동맥경화로 야기될 수 있는 심각한 합병증 예방에 대단히 효과적이다.

147> <적용 예 6> 염증 반응

<148> 염증이란 국소적인 손상에 대한 혈관이 있는 살아있는 조직의 반응으로 감염, 외상 등 여러 요인에 의해 생길 수 있지만 원인과 반응 조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 나타낸다. 이 변화에는 혈류의 증가, 혈관벽의 투과성 증가, 백혈구의 침윤이 있는데 이 모든

변화에 혈관 신생이 원인과 결과로 일어난다고 보고되어 있다(Jackson, J. R. 11, 457-465, 1997). 염증이라는 것은 손상에 대한 수복 기전이므로 해로운 반응은 아니지만 과다하게 일어나거나, 자가면역의 경우와 같이 부적절하게 일어날 경우 염증 변화 자체로 조직의 손상과 변형을 초래할 수 있다. 이런 과하거나 부적절한 염증 반응을 조절하는데 있어 혈관신생을 억제시키는 본 발명의 억제제가 효과적이다.

【발명의 효과】

<149> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 YH 모티프를 포함하는 웹타이드를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 억제제는 $\alpha v \beta 3$ 인테그린과 상호작용하여 세포 부착 및 세포이동을 억제시켜 혈관신생을 억제함으로써, 혈관신생과 관련된 질병인 암을 포함한 관절염, 건선, 당뇨성 안질환, 동맥경화 및 염증 반응과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

fas-1 도메인의 티로신-히스티딘 아미노산 서열(YH 모티프)을 포함하는 펩타이드를 유효 성분으로 함유하는 혈관신생 억제제.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 (I, D, E 또는 K)-(E, A 또는 Q)-L-(L, R 또는 A)-(N, D 또는 S)-(A, L, K 또는 I)-(L 또는 Y)-(R, N, L 또는 K)-(Y 또는 N)-H-(M, I 또는 G)-(V, L, Q 또는 G)-(G, K, T 또는 D)-(R, S, L 또는 E)-(R, A, E 또는 I)-(V, M, T 또는 L)-(L, C 또는 V)-(T, A, G 또는 S) 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 억제제.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 억제제.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 펩타이드는 β ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인 중 서열번호 5 (548-614번 아미노산 절편)로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 억제제.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 YH 모티프는 β ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인 중 서열번호 6 (502-632번 아미노산 절편)으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 억제제.

【청구항 6】

제 1항의 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제.

【청구항 7】

제 1항의 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 관절염 치료제.

【청구항 8】

제 1항의 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 건선 치료제.

【청구항 9】

제 1항의 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 당뇨성 안질환 치료제.

【청구항 10】

제 1항의 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 동맥경화 치료제.

10 021065

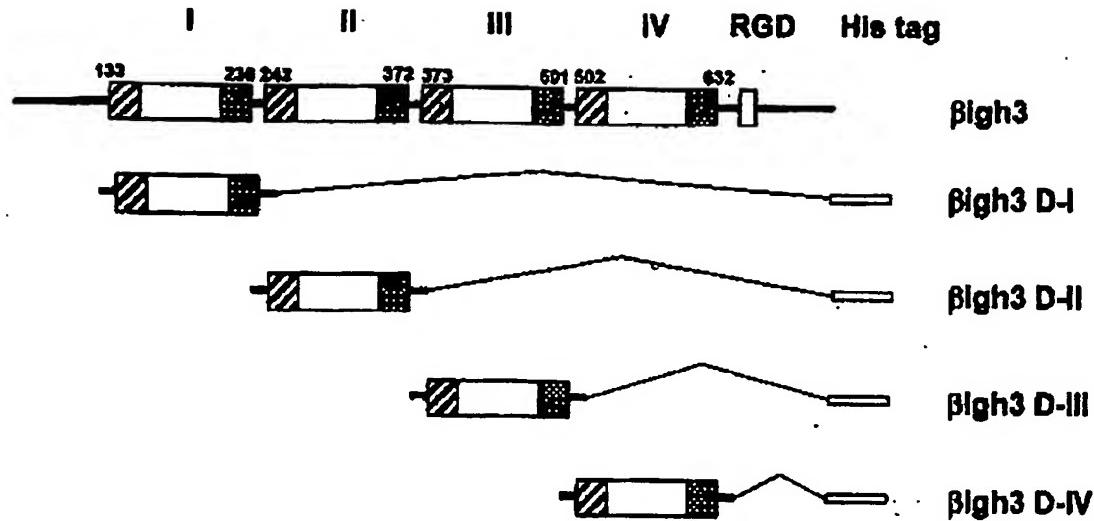
출력 일자: 2004/4/14

【청구항 11】

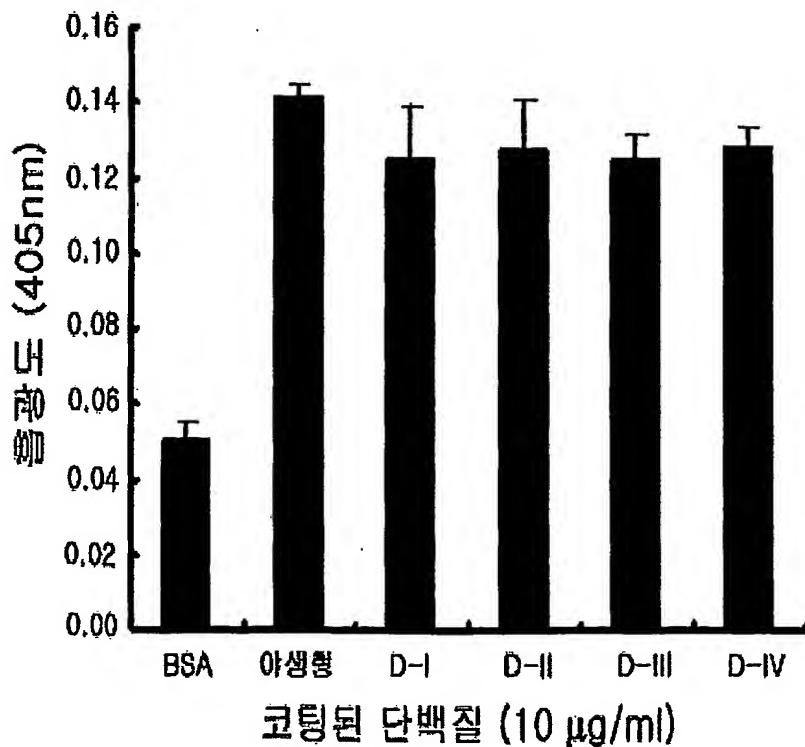
제 1항의 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 염증 반응 치료제.

【도면】

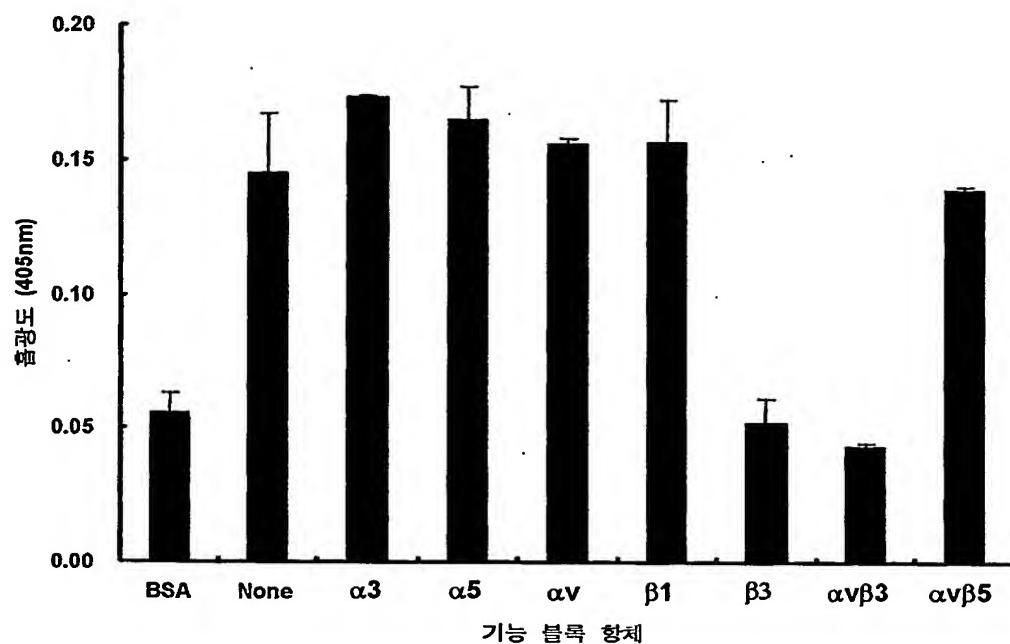
【도 1】



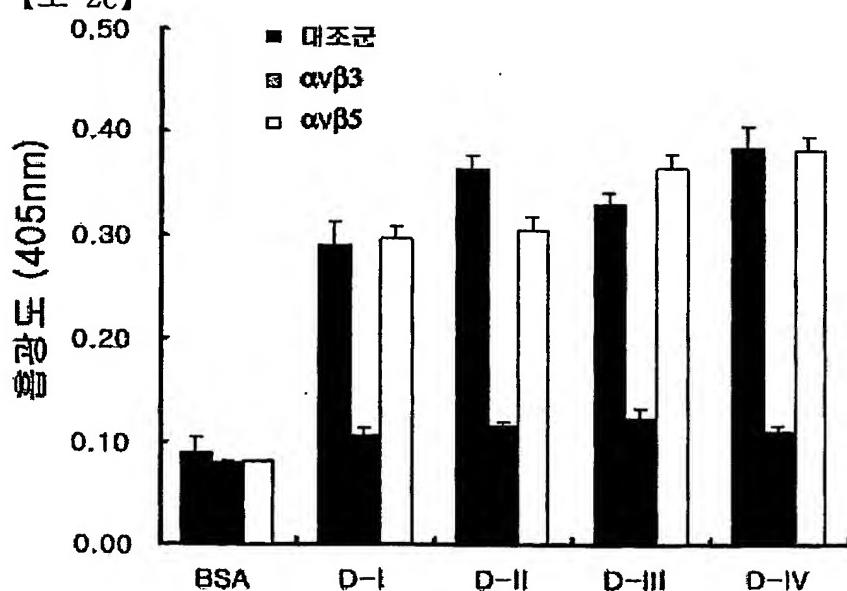
【도 2a】



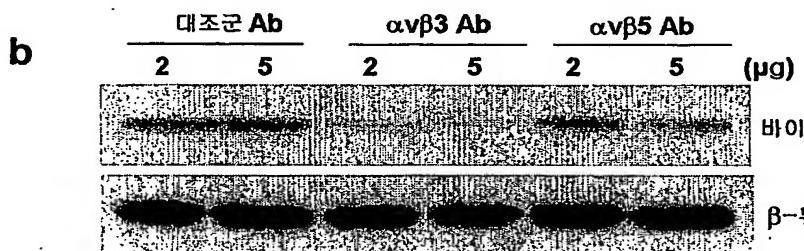
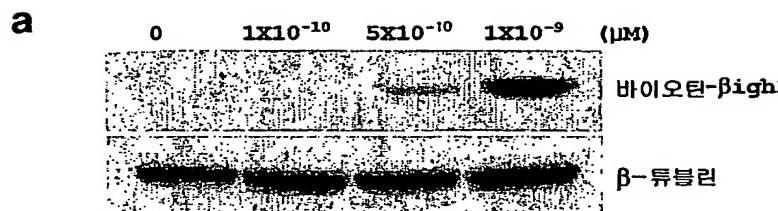
【도 2b】



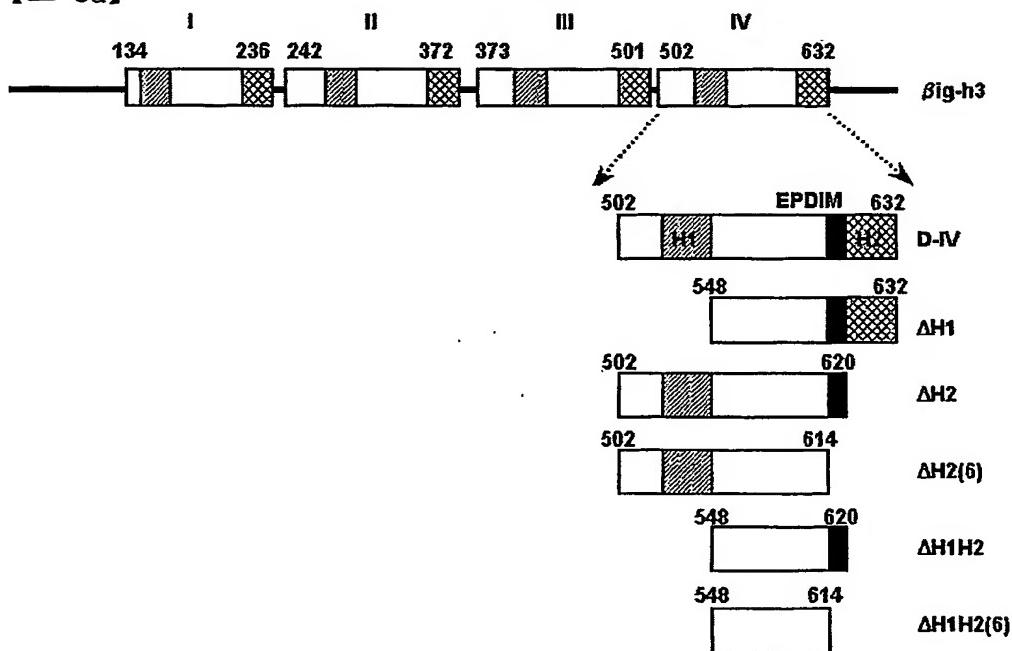
【도 2c】



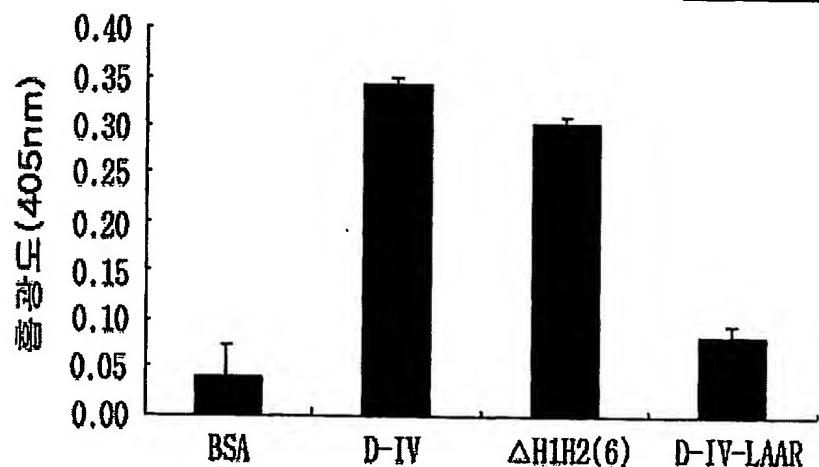
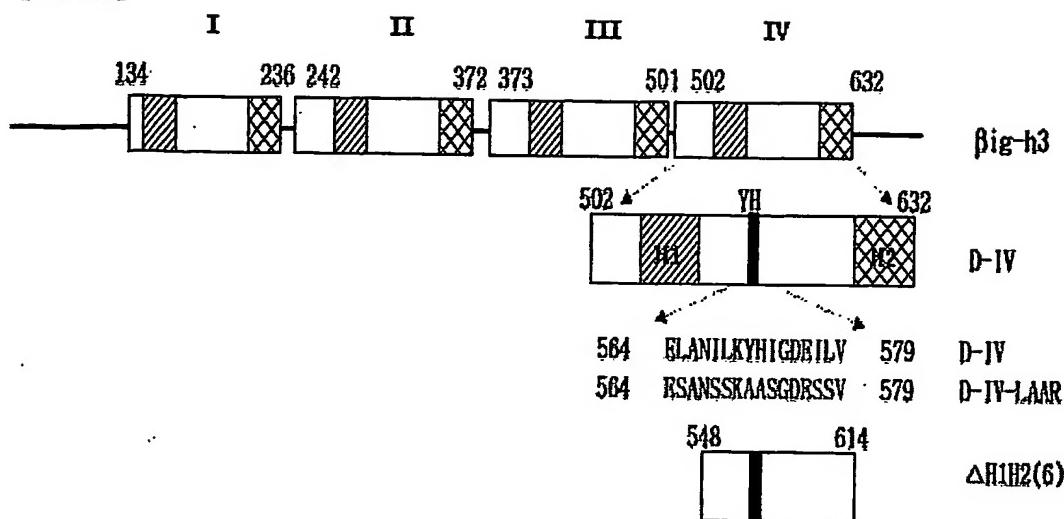
【도 2d】



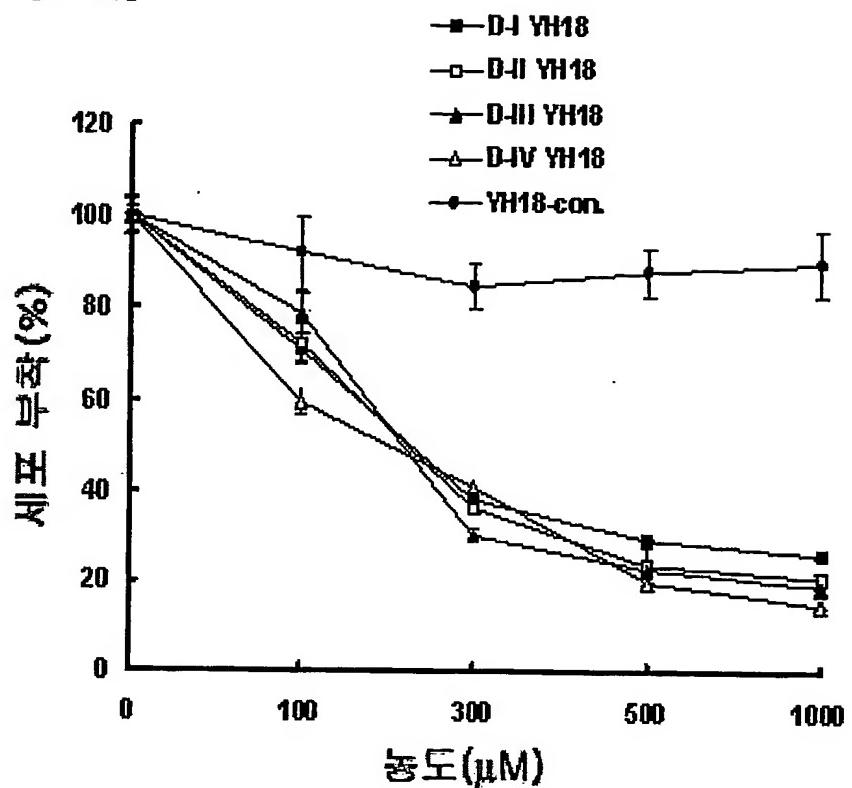
【도 3a】

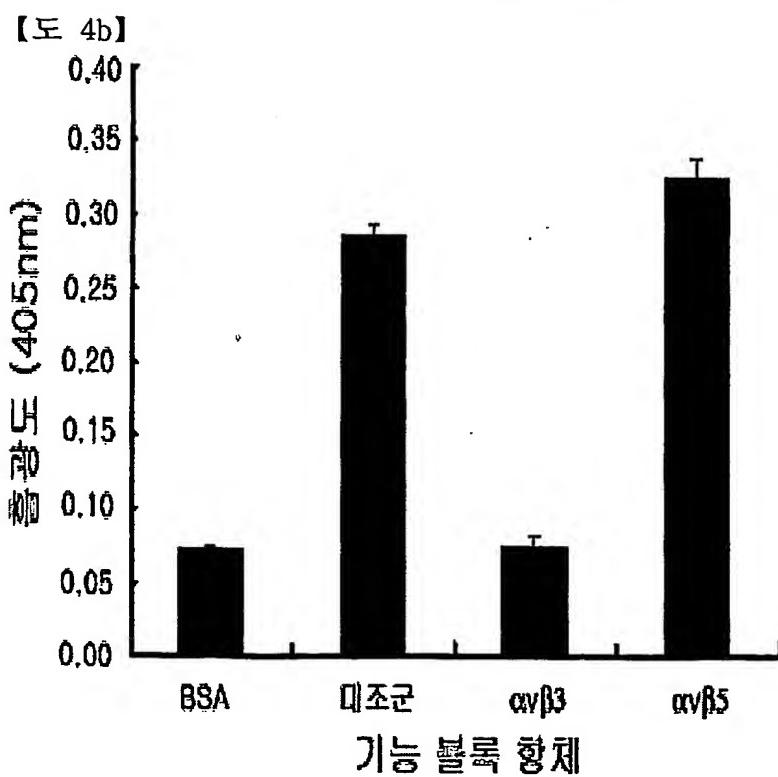
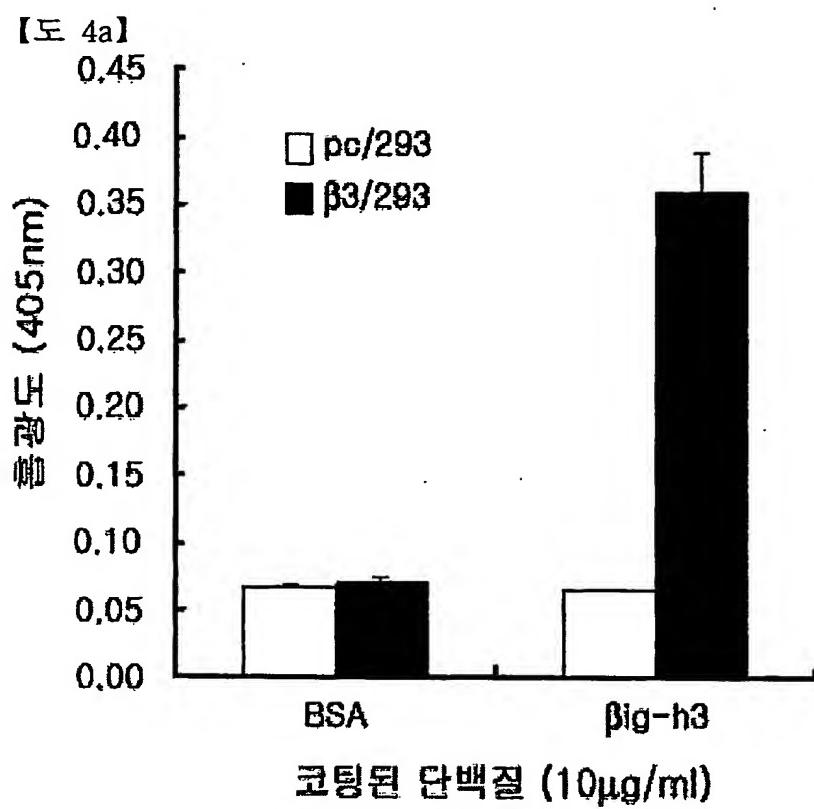


【도 3b】

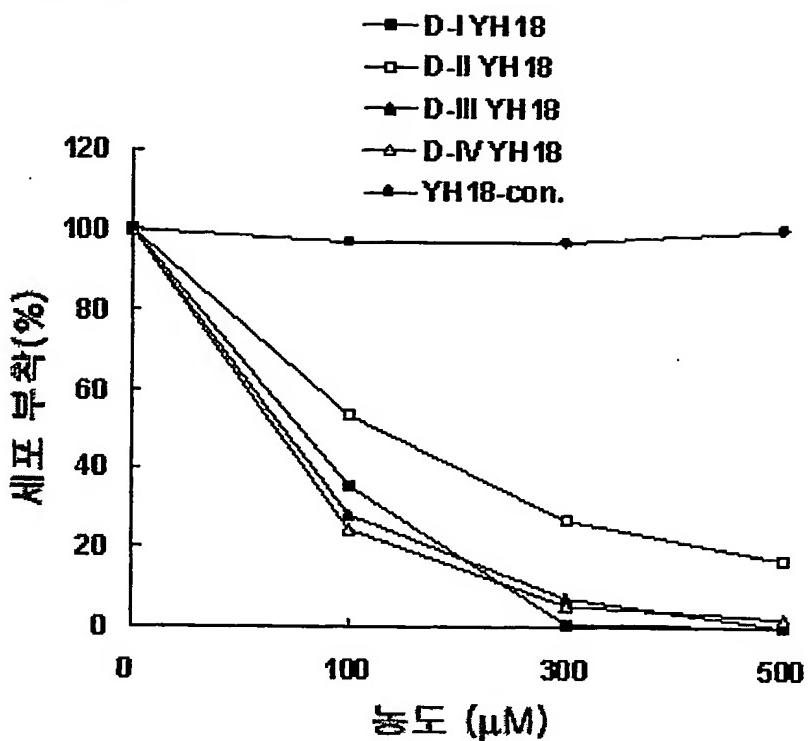


【도 3c】

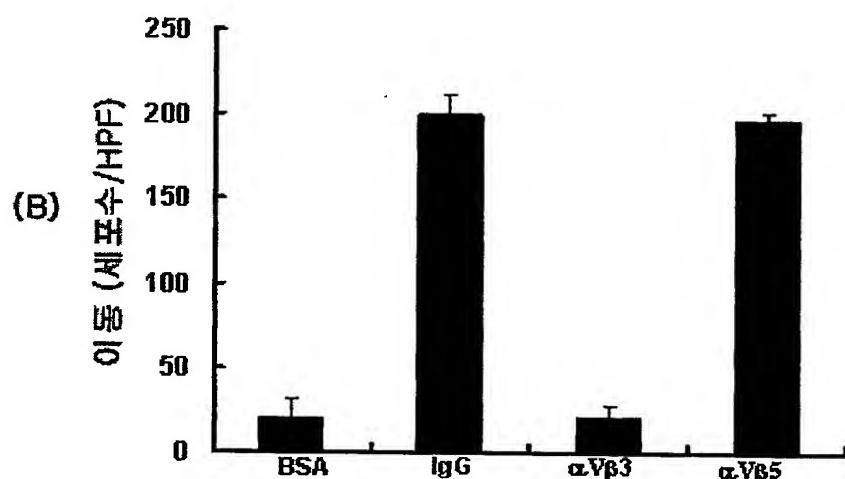
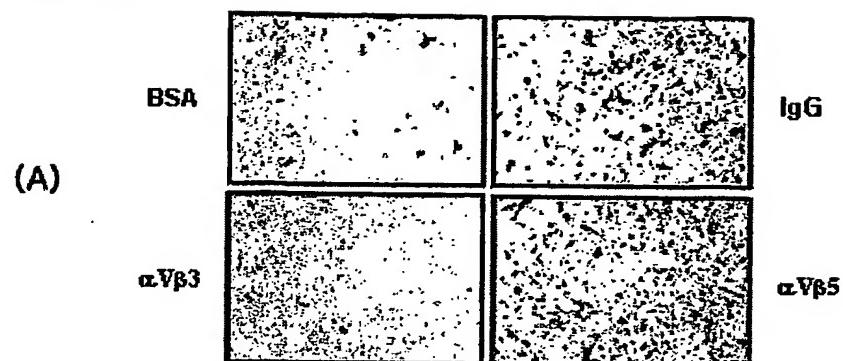




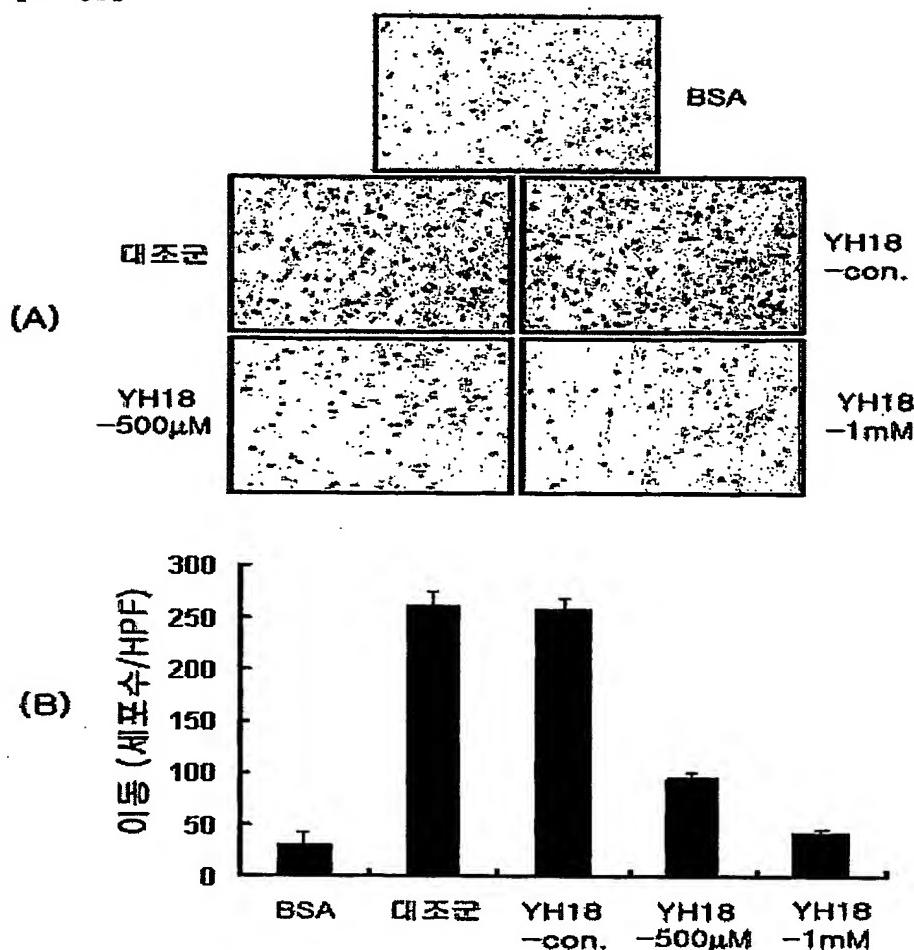
【도 4c】



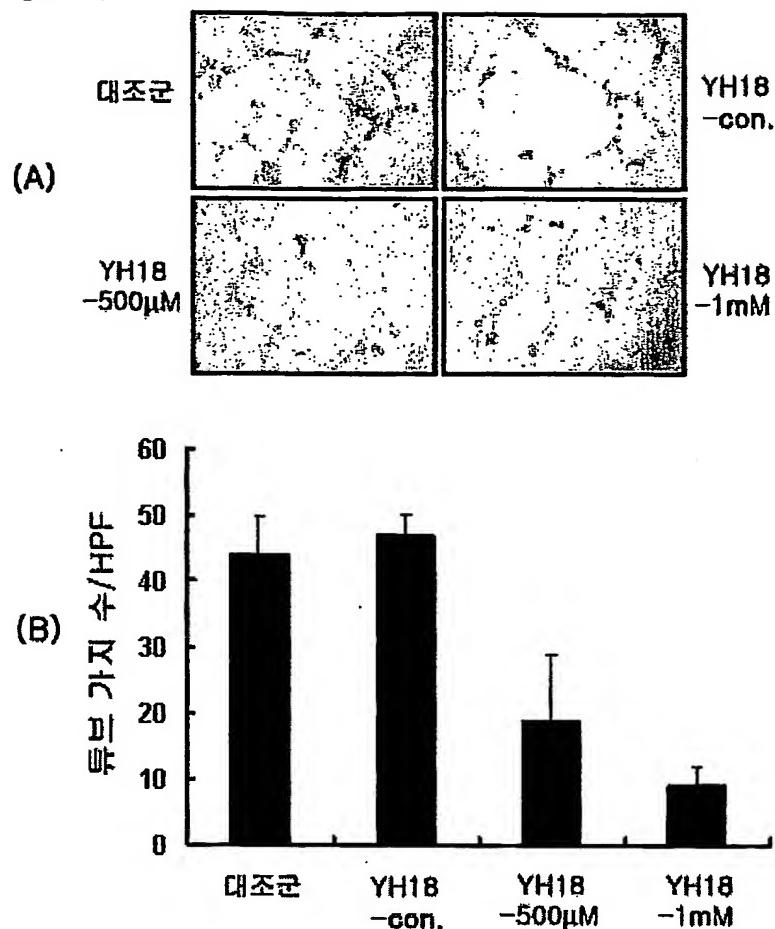
【도 5a】



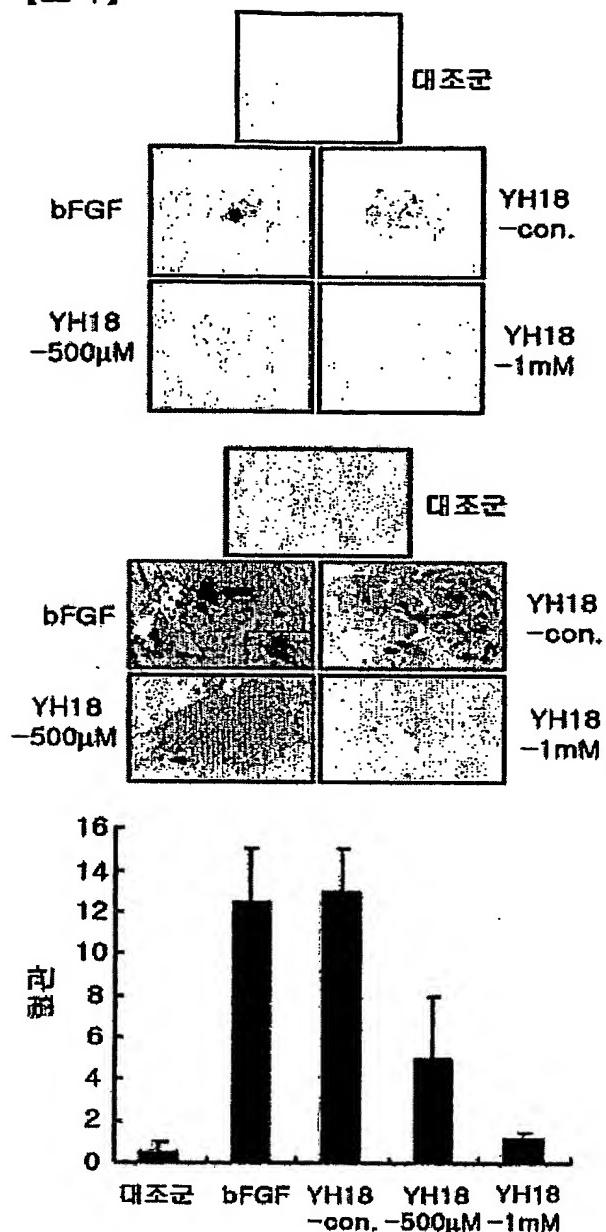
【도 5b】



【도 6】



【도 7】



【서열목록】

<110> REGEN BIOTECH, INC. <120> Agent for inhibiting angiogenesis, containing peptides which comprise YH motif as effective component <130> 3p-01-04 <160> 8 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 18 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> D-I YH18 <400> 1 Ile Glu Le
Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val Gly Arg Arg Val 1 5 10

15 Leu Thr <210> 2 <211> 18 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> D-II YH18
 <400> 2 Glu Ala Leu Arg Asp Leu Leu Asn Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met 1 5
 10 15 Cys Ala <210> 3 <211> 18 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <
 223> D-III YH-18 <400> 3 Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr 1
 5 10 15 Leu Gly <210> 4 <211> 18 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> D-IV YH18 <400> 4 Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile
 Leu 1 5 10 15 Val Ser <210> 5 <211> 67 <212>
 PRT <213> Homo sapiens <400> 5 Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys 1
 5 10 15 Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val
 20 25 30 Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly As
 35 40 45 Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Gl
 50 55 60 Pro Val Ala 65 <210> 6 <211> 131 <212> PRT <
 213> Homo sapiens <400> 6 Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met 1
 5 10 15 Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg
 20 25 30 Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Al
 35 40 45 Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Le
 50 55 60 Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gl
 65 70 75 80 Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Le
 Gln Gly Asp Lys Leu 85 90 95 Glu Val Ser Leu Lys Asn
 Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val 100 105 110 Ala Glu
 Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr 115 120 12
 Asn Val Leu 130 <210> 7 <211> 131 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 D-IV-LAAR <400> 7 Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met 1 5
 10 15 Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg 20
 25 30 Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala 35

40 45 Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Ser 50
55 60 Ala Asn Ser Ser Lys Ala Ser Ser Gly Asp Glu Ser Ser Val Ser Gly 65
70 75 80 Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gin Gly Asp Lys Le
85 90 95 Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Va
100 105 110 Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile
Thr 115 120 125 Asn Val Leu 130 <210> 8 <211> 18 <
212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> YH18-con <400> 8 Lys Glu Leu Ala Asn Ile His
Gly Ile Lys Leu Tyr Asp Glu Ile Leu 1 5 10 15 Val Ser